

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.125

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH CỦA VI KHUẨN BẢN ĐỊA CHO SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN Ở BẠCH LONG, TỈNH NAM ĐỊNH

Đỗ Quang Trung^{1*}, Vũ Văn Hạnh² và Lưu Thế Anh¹

¹Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Quang Trung (email: trungcnsinh@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 18/05/2022

Ngày duyệt đăng: 23/05/2022

Title:

Isolation and characterization of native probiotics for aquaculture farming in Bach Long, Nam Dinh

Từ khóa:

Bacillus amyloliquefaciens, bổ sung probiotic, nuôi trồng thủy sản, vi khuẩn bản địa

Keywords:

Aquaculture, *Bacillus amyloliquefaciens*, native bacteria, probiotic supplementation

ABSTRACT

Probiotic supplements are able to improve animal health and nutrition but respective bacteria have mainly been isolated from terrestrial, warm-blooded hosts, limiting an efficient application in shrimp, fish, and clams. Probiotics from native bacterial species adapted to the digestive tracts of the respective aquatic species are therefore more effective. In this study, 194 bacterial strains were isolated from the digestive systems of clams, shrimp, and fish. The strain TON1.4 showed high extracellular enzyme activity and the ability to inhibit the best tested bacterial strains. The 16S rDNA gene sequencing results showed that strain TON1.4 is *Bacillus amyloliquefaciens*. Moreover, strain TON1.4 is also able to tolerate pH from 5 to 9, and salt concentration from 0.5 to 6%. The strategy of isolation and characterization of native bacterial strains with potential for probiotic production is presented that can be easily adapted to other aquatic species.

TÓM TẮT

Thực ăn bổ sung probiotic có thể cải thiện sức khỏe và dinh dưỡng của vật nuôi, nhưng vi khuẩn tương ứng chủ yếu được phân lập từ vật chủ máu nóng trên cạn, hạn chế ứng dụng hiệu quả trên tôm, cá và ngao. Chế phẩm sinh học từ loài vi khuẩn bản địa thích nghi với đường tiêu hóa của các loài thủy sản tương ứng do đó sẽ hiệu quả hơn. Trong nghiên cứu này, 194 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ hệ tiêu hóa của ngao, tôm, và cá. Chủng TON1.4 cho thấy hoạt tính enzyme ngoại bào cao và khả năng ức chế các chủng vi khuẩn kiểm định tốt nhất. Kết quả giải trình tự gen 16S rDNA cho thấy chủng TON1.4 là *Bacillus amyloliquefaciens*. Hơn nữa, chủng TON1.4 cũng có khả năng chịu được pH từ 5 đến 9, nồng độ muối từ 0,5 đến 6%. Chiến lược phân lập và xác định đặc điểm của các chủng vi khuẩn bản địa được trình bày có tiềm năng cho sản xuất probiotic, có thể dễ dàng thích nghi với các loài thủy sản khác.

1. GIỚI THIỆU

Ngành thủy sản ở Việt Nam nói chung và Nam Định nói riêng đang được đầu tư và phát triển mạnh.

Tuy nhiên, trong những năm gần đây, việc thâm canh hóa với mật độ cao kèm khí hậu thay đổi thất thường làm bùng phát dịch bệnh trên động vật thủy

sản. Thêm vào đó, chất lượng nước và môi trường nuôi bị ô nhiễm làm ảnh hưởng đến sản lượng nuôi. Mặt khác, việc sử dụng thuốc kháng sinh để trị bệnh trên động vật thủy sản thường xuyên và không đúng liều lượng đã tạo ra một số dòng vi khuẩn kháng thuốc (World Bank, 2013).

Việc sử dụng các hoá chất trên toàn thế giới trong các ngành công nghiệp khác nhau ngày càng tăng và có ảnh hưởng tới sức khỏe con người. Ngoài ra, việc thay thế các hoá chất độc hại bằng các sản phẩm thân thiện với môi trường đang ngày càng được quan tâm và phát triển. Do đó, cần phải có một giải pháp cải thiện chất lượng môi trường nuôi mà không ảnh hưởng đến động vật thủy sản và con người (Cabello et al., 2013; Madhana et al., 2021; Mondal et al., 2022).

Hiện nay, việc sử dụng vi sinh vật hữu ích vào trong nuôi trồng thủy sản nhằm khắc phục những vấn đề trên là một giải pháp đang được ứng dụng rộng rãi. Theo Bao and Shen (2005), hệ thống nuôi thủy sản bền vững cần có sự hiện diện của nhóm vi khuẩn có lợi. Nhóm vi khuẩn này không chứa độc tố, không hiệu ứng phụ, không tồn lưu và không kháng kháng sinh. Nhóm vi khuẩn này hiệu quả trong việc cải thiện môi trường, tăng hệ miễn dịch của vật nuôi, giảm stress và duy trì trạng thái cân bằng của hệ sinh thái thủy vực (Hoseinifar et al., 2018; Madhana et al., 2021). Vi khuẩn được biết đến là một trong những đối tượng quan trọng nhất trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học và các chủng *Bacillus* sp được biết đến là chúng có khả năng phân giải các hợp chất hữu cơ trong đất nhờ các hoạt chất enzyme như protease, amylase, cellulase, góp phần khép kín vòng tuần hoàn vật chất trong tự nhiên (Madhana et al., 2021). Đặc tính này còn được ứng dụng trong quá trình chế biến phân huỷ rác.

Trong quá trình sống, vi khuẩn tiết ra nhiều chất có hoạt tính sinh học cao, có khả năng kháng lại các loài vi sinh vật khác nhau như nấm và vi khuẩn. Việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn mới có khả năng thích nghi, ứng dụng cao và phát triển phục vụ cho nuôi trồng thủy sản là rất cần thiết.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Các mẫu phân lập được thu nhận tại Bạch Long, Giao Thủy, tỉnh Nam Định gồm có cá, tôm và ngao.

Vi sinh vật kiểm định: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Vibrio harveyi* và *V. parahaemolyticus* từ Bộ sưu tập chủng giống của

phòng Các chất chức năng sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

2.2. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu

Các hóa chất nuôi cấy và định tính, định lượng từ các hãng Sigma, Merk, Oxoid, Wako (Nhật Bản), Ấn Độ, Trung Quốc và Việt Nam.

Máy móc, thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu thuộc Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường thạch LB (g/L): peptone 10, cao nấm men 5, NaCl 5, agar 20, nước 1 lít, pH 7,0 ± 0,2.

Môi trường xác định hoạt tính enzyme: môi trường LB thạch có chứa 0,1% CMC (Carboxymethyl cellulose), môi trường LB thạch chứa 1% tinh bột, môi trường LB thạch chứa 1% casein 1%, môi trường LB thạch chứa 1% phosphate. Tất cả các môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút và để nguội trước khi sử dụng.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phân lập và định danh vi khuẩn

Mẫu ruột từ tôm, cá và ngao được cho vào ống eppendorf riêng rẽ có chứa 0,9 mL nước muối sinh lý khử trùng. Mẫu được pha loãng đến nồng độ 10⁻⁴ rồi cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường LB thạch và bọc kín bằng túi nilon, ủ ở 37°C.

Sau 2 ngày quan sát các khuẩn lạc, cấy chuyên để tách các dòng vi khuẩn thuần. Khi các khuẩn lạc đã thuần sau nhiều lần cấy chuyên, chúng được giữ giống và bảo quản ở -80°C trong glycerol 30%. Các khuẩn lạc riêng rẽ được sử dụng để kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn và sinh tổng hợp enzyme.

Chủng vi khuẩn chọn lọc được định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA: tách chiết bộ gen vi khuẩn bằng bộ kit của QIAgen, khuếch đại trình tự 16S rDNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi có trình tự như sau: 27 F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), và 1492 R (5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3').

Sản phẩm PCR được chạy kiểm tra trên gel agarose 1% và được làm sạch bằng kit (QIAquick PCR Purification Kit) và gửi giải trình tự tại hãng First Base (The Gemini, Singapore Science Park II, Singapore). Các trình tự nucleotide hoàn chỉnh được so sánh với ngân hàng cơ sở dữ liệu sinh học (National Center for Biotechnology Information, NCBI) bằng cách sử dụng công cụ tìm kiếm các trình tự tương đồng (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST).

2.4.2. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme

Các đĩa LB thạch được đục các lỗ thạch đường kính 7 mm. Chúng vi khuẩn được nuôi qua đêm (10^6 cfu/mL) và ly tâm để thu dịch nổi. Năm mươi μ L dịch ly tâm được hút vào từng giếng, sau đó các đĩa được giữ ở nhiệt độ phòng để dịch được khuếch tán đều. Các đĩa được ủ ở 37°C , trong 24 giờ, sau đó, chúng được quan sát và đo kích thước vòng thủy phân (nếu có). Hoạt tính enzyme được tính bằng đường kính vòng thủy phân không bị nhuộm màu bởi thuốc nhuộm.

Kích thước vòng thủy phân (mm) $\Delta = D - d$ (D là đường kính vòng thủy phân, mm; d: đường kính lỗ thạch, mm).

Xác định hoạt tính enzyme amylase: Môi trường xác định hoạt tính amylase là môi trường LB bổ sung tinh bột tan (1%) và agar (2%) (Bibi et al., 2017).

Xác định hoạt tính enzyme cellulase: môi trường LB bổ sung CMC (1%) và agar (2%) (da Cruz Ramos et al., 1985).

Xác định hoạt tính enzyme protease: môi trường LB bổ sung casein (1%) và agar (2%) (Hung et al., 2007).

Xác định hoạt tính enzyme phytase: môi trường LB chứa phosphate (1%) và agar (2%) (de Oliveira Costa et al., 2012)

Đĩa xác định hoạt tính enzyme amylase, cellulase sau khi ủ được nhuộm màu bằng Lugol 1,5% và đo đường kính vòng thủy phân. Đối chứng dương là các enzyme tương ứng (từ Sigma), nồng độ 1 mg/mL.

Đĩa xác định hoạt tính enzyme protease sau khi ủ được nhuộm màu bằng TCA 25% và đo đường kính vòng thủy phân. Đối chứng dương là enzyme Neutron protease (Sigma) 1 mg/mL.

2.4.3. Khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh

Phương pháp đối kháng trực tiếp được sử dụng để khảo sát đặc tính đối kháng với 5 chủng vi khuẩn kiểm định. Các chủng kiểm định được cấy trải trên bề mặt môi trường thạch LB (100 μ L dịch vi khuẩn ở nồng độ 10^6 cfu/mL) trước khi đục lỗ thạch có đường kính 7 mm.

Các chủng vi khuẩn được nuôi qua đêm ở 37°C . 1mL dịch vi khuẩn (10^6 cfu/mL) được ly tâm ở 4°C , 1000 rpm để thu dịch nổi. 50 μ L dịch lên men sau ly tâm được hút và tra vào các lỗ thạch, sau đó, đĩa được giữ trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C để dịch khuếch

tán đều. Các đĩa được ủ ở 37°C . Sau 24 giờ, đĩa được lấy ra quan sát và đo kích thước vòng kháng khuẩn (nếu có). Đối chứng dương là Streptomycin 0,1 g/mL. Kích thước vòng kháng khuẩn (mm) = D - 7 (D là đường kính vòng kháng khuẩn, mm).

2.4.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính của chất kháng khuẩn có bản chất là protein

Để đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của chất kháng khuẩn có bản chất là protein (bacteriocin), dịch lên men chủng vi khuẩn được ủ tại các nhiệt độ khác nhau trong khoảng từ 40 đến 100°C trong 30 phút. Hoạt tính bacteriocin còn lại được xác định bởi phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của pH lên bacteriocin được xác định bằng cách điều chỉnh giá trị pH của dịch sau lên men của vi khuẩn bởi HCl và NaOH 1N từ 3 đến 12, với bước nhảy là 1 và ủ trong 2 giờ ở 37°C . Tất cả các mẫu sau đó được điều chỉnh lại đạt giá trị pH trung tính trước khi kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn.

2.4.5. Phương pháp khảo sát đặc tính sinh trưởng của các vi khuẩn phân lập được

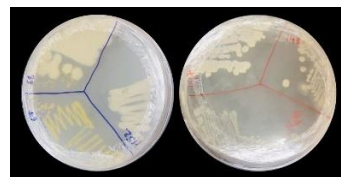
Khả năng chịu pH: Các chủng tuyển chọn được cấy trong môi trường LB được điều chỉnh pH bằng HCl và NaOH theo các giá trị pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Nuôi cấy lắc ở 150 rpm, 37°C , đo OD_{600nm} để xác định mật độ vi khuẩn sau 18 giờ.

Khả năng chịu mặn: Các chủng tuyển chọn được cấy trong môi trường LB bổ sung thêm NaCl với các nồng độ: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; và 6%. Nuôi cấy lắc ở 150rpm, 37°C , đo OD_{600nm} để xác định mật độ vi khuẩn sau 18 giờ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn

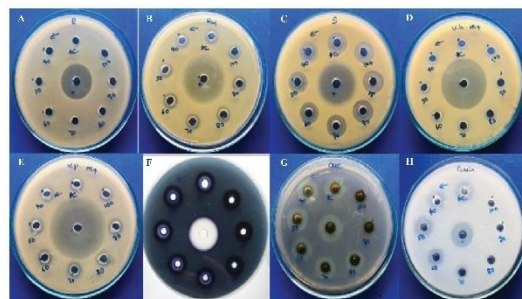
Các mẫu phân lập thu thập từ biển và các ao nuôi được xử lý bề mặt và thu thập mẫu nội tạng để phân lập vi sinh vật. 22 mẫu đã phân lập được 194 chủng vi khuẩn đặc trưng và hoạt tính của các chủng này được tiến hành kiểm tra. Hình ảnh khuẩn lạc và màu sắc của một số chủng vi khuẩn được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Hình ảnh một số khuẩn lạc với màu sắc và hình thái khác nhau

Căn cứ vào đường kính vòng phân giải của các chủng vi khuẩn phân giải amylase, cellulase, protease, phytase và hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn kiểm định, chủng TON1.4 với hoạt tính tốt nhất được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Đặc tính của chủng TON1.4 được minh họa trong Hình 2, được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2. Kết quả phân tích trình tự nucleotide cho thấy chủng TON1.4 là loài *Bacillus amyloliquefaciens* và trình tự đoạn gen của 16S rDNA đã được lưu trên ngân hàng gen với mã số MZ484519.

Do đó, chủng TON1.4 được chọn cho nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, độ mặn đến khả năng sống của chủng.



Hình 2. Khả năng kháng các chủng vi khuẩn kiểm định của chủng TON1.4 trên môi trường LB (A-E) và khả năng sinh tổng hợp enzyme trên các môi trường chứa cơ chất đặc hiệu ở 37°C sau 24 giờ (F-H).

Bảng 1. Khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng TON1.4

Tên mẫu	Kích thước đường kính vòng thủy phân ($\Delta=D-d$) (mm)			
	Amylase	Cellulase	Protease	Phytase
ĐC	8	18	11	+
TON1.4	7	15	+	11

Bảng 2. Khả năng kháng các vi khuẩn kiểm định của chủng TON1.4

Tên mẫu	Kích thước đường kính vòng thủy phân ($\Delta=D-d$) (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
ĐC	17	23	21	20
TON1.4	-	10	+	3

3.2. Ảnh hưởng của hoạt tính kháng khuẩn qua các thể hệ nuôi cấy của chủng vi khuẩn TON1.4

Dịch lên men của các chủng vi khuẩn được ly tâm ở 10.000 rpm trong 5 phút, sau đó thu dịch nổi. Năm mươi μ L dịch nổi được hút cho vào các giếng trên môi trường có các chủng vi khuẩn kiểm định để kiểm tra khả năng kháng các chủng vi khuẩn kiểm định của các chủng. Kết quả được trình bày trong Bảng 3. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, hầu hết các chủng đều không có khả năng kháng *E. coli*. Trong đó, các chủng có khả năng kháng *S. aureus* đều và ổn định.

Bảng 3. Khả năng kháng *S. aureus* của chủng TON1.4 từ thể hệ 2 đến 5

Tên mẫu	Kích thước đường kính vòng kháng khuẩn ($\Delta=D-d$) (mm)			
	Thế hệ 2	Thế hệ 3	Thế hệ 4	Thế hệ 5
ĐC	22	21	21	22
TON1.4	8	8	8	9

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của các chủng vi khuẩn TON1.4

Dịch lên men chủng TON1.4 được ủ ở các nhiệt độ khác nhau trong dải từ 40 đến 100°C. Sau 30 phút, dịch lên men được mang đi ly tâm ở 10.000 rpm trong 5 phút rồi kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzyme. Kết quả được trình bày trong Bảng 4 và Bảng 5.

Kết quả trong Bảng 4 cho thấy, sau khi xử lý với nhiệt ở các nhiệt độ khác nhau, hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn kiểm định *Salmonella* và *V. parahaemolyticus* giảm dần trong dải nhiệt độ ủ và thấp hơn đối chứng, hoạt tính kháng bắt đầu giảm từ 80°C. Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy từ 70°C, hoạt tính kháng chủng *S. aureus* tăng nhưng không đáng kể. Chủng TON1.4 có khả năng kháng hai chủng *V. harveyi* và *E. coli*.

Với kết quả thử hoạt tính enzyme trên 4 loại cơ chất khác nhau cho thấy, 3 enzyme amylase, protease, và phytase đều mất hoạt tính ở >70°C, trong khi với cellulase là 100°C (Bảng 5). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy hoạt tính enzyme amylase trước và sau khi ủ yếu. Ở dải nhiệt độ từ 37 đến 70°C, hoạt tính enzyme cellulase không có sự thay

đôi so với đối chứng (không xử lý nhiệt) và giảm dần từ 80°C.

Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ye et al. (2017), trong đó chủng *Bacillus amyloliquefaciens* S1 có khả năng tạo ra cellulase mạnh nhất với nhiệt độ lên men là 37°C. Khi nhiệt độ tăng, hoạt động của các enzym đầu tiên tăng lên và sau đó giảm xuống.

3.4. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của chủng vi khuẩn TON1.4

Dịch lên men chủng TON1.4 được điều chỉnh bằng HCl hoặc NaOH 1N về các pH khác nhau trong dải từ 3 đến 12 và ủ ở 37°C. Sau 2 giờ, dịch lên men được trung hoà về pH ban đầu và được ly tâm ở 10.000 rpm trong 5 phút rồi kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính enzyme. Kết quả được trình bày trong Bảng 6 và Bảng 7.

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn kiểm định có sự khác nhau giữa các chủng (Bảng 6). Sau khi được xử lý trong dải pH

từ 3 đến 12, dịch lên men của chủng phân lập vẫn có khả năng kháng *S. aureus* và hoạt tính giảm nhẹ ở pH cao. Trong khi đó, chủng *V. paraheamolyticus* bị kháng yếu trong dải pH từ 6 đến 10, không kháng được ở pH ngoài khoảng trên. Dịch lên men của chủng sau xử lý cũng có khả năng kháng *Salmonella typhi* yếu trong khoảng pH từ 3 đến 10, sau đó mất hoạt tính ở pH cao hơn.

Từ kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, pH có ảnh hưởng đáng kể tới hoạt tính enzyme (Bảng 7). Cụ thể, hoạt tính enzyme amylase yếu và có hoạt tính trong khoảng pH từ 6 đến 10, hoạt tính cellulase giảm mạnh ở pH thấp (pH ≤4) và cao (pH 12). Trong khi đó, protease chỉ có hoạt tính yếu (tương đương với ĐC) trong khoảng pH từ 6 đến 9. Phytase duy trì hoạt tính ở pH rộng, pH >10 hoạt tính của phytase bị giảm dần. Ye et al. (2017) báo cáo giá trị pH môi trường lên men ban đầu tối ưu của *Bacillus amyloliquefaciens* S1 là 6 và lượng enzyme ổn định trong khoảng pH từ 5 đến 6, trong khi khả năng tạo enzyme giảm đáng kể ở pH ban đầu từ 7 đến 9.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng kháng khuẩn của chủng TON1.4

Nhiệt độ	Kích thước đường kính vòng kháng khuẩn (Δ=D-d) (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. paraheamolyticus</i>
ĐC (Không ủ)	-	4	7	+	4
40	-	4	7	+	3
50	-	4	7	+	3
60	-	4	7	-	3
70	-	4	8	-	3
80	-	3	8	-	2
90	-	3	8	-	2
100	-	2	8	-	2

Chú thích: (+): có hoạt tính nhưng nhỏ, (-): không có hoạt tính

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính enzyme của chủng TON1.4

Nhiệt độ	Kích thước đường kính vòng thủy phân (Δ=D-d) (mm)			
	Amylase	Cellulase	Protease	Phytase
ĐC (Không ủ)	12	11	7	10
40	+	11	7	10
50	+	9	4	10
60	+	9	3	9
70	+	9	+	8
80	-	8	-	-
90	-	3	-	-
100	-	-	-	-

Chú thích: (+): có hoạt tính nhưng nhỏ, (-): không có hoạt tính

Bảng 6. Ảnh hưởng của pH đến khả năng kháng khuẩn của chủng TON1.4

pH	Kích thước đường kính vòng kháng khuẩn ($\Delta=D-d$) (mm)				
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
3	-	3	7	-	-
4	-	3	6	-	-
6	-	3	6	-	+
8 (ĐC)	-	4	6	+	+
9	-	4	6	+	+
10	-	3	7	+	+
11	-	+	6	-	-
12	-	-	5	-	-

Chú thích: (+): có hoạt tính nhưng nhỏ, (-): không có hoạt tính

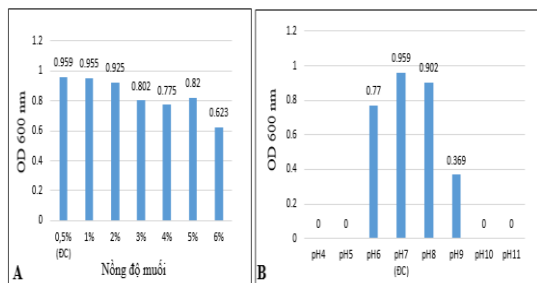
Bảng 7. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme của chủng TON1.4

pH	Kích thước đường kính vòng thủy phân ($\Delta=D-d$) (mm)			
	Amylase	Cellulase	Protease	Phytase
3	-	4	-	7
4	-	5	-	9
6	+	9	+	9
8 (ĐC)	+	9	+	9
9	+	9	+	9
10	+	8	-	8
11	-	8	-	-
12	-	3	-	-

Chú thích: (+): có hoạt tính nhưng nhỏ, (-): không có hoạt tính

3.5. Ảnh hưởng của pH và độ mặn lên sự sinh trưởng của chủng vi khuẩn TON1.4

Giá trị pH của môi trường ảnh hưởng đến sinh trưởng và sinh tổng hợp của vi sinh vật không giống nhau. Muốn phát triển và sinh tổng hợp enzyme mạnh nhất thì chủng vi khuẩn chọn lọc đòi hỏi phải có một khoảng pH thích hợp. Thí nghiệm được tiến hành trên 8 mức pH môi trường khác nhau.



Hình 3. OD_{600nm} của chủng TON1.4 ở các nồng độ muối NaCl (A) và nồng độ pH (B) khác nhau sau 18 giờ nuôi cấy

Từ kết quả trên Hình 3, chủng TON1.4 có khả năng chịu được pH từ 6 đến 9 (Hình 3a), nồng độ muối từ 0,5 đến 6% (Hình 3b). Ở độ pH 7, nồng độ muối từ 0,5 đến 2% là điều kiện sinh trưởng tối ưu.

Các nồng độ muối khác nhau trong thí nghiệm không làm thay đổi tốc độ sinh trưởng của chủng. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Sutin (2010), trong đó tác giả cho thấy phạm vi độ mặn đó (0-4%) là cần thiết cho sự phát triển tối ưu của các loài ven biển. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này có sự sai khác với kết quả nghiên cứu của Mevel and Prieur (2000). Tác giả báo cáo rằng chủng *Bacillus* sp. MS30 có độ mặn sinh trưởng tối ưu là 16 g/L NaCl, và không thể phát triển khi độ mặn tăng lên 28,50 g/L NaCl. Theo kết quả nghiên cứu gần đây, các chủng *Bacillus* có thể tồn tại đến nồng độ muối là 7% (Zulkhairi Amin et al., 2020). Sự khác nhau này có thể do sự khác nhau về chủng *Bacillus* sp. được sử dụng trong nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *Bacillus* sp. phân lập được phát triển chậm ở pH từ 3 đến 5. Chúng phát triển tối ưu ở pH 7 và sau đó sự tăng trưởng giảm dần từ pH 9 đến 11 (Hình 3b). Kết quả này phù hợp với các kết quả nghiên cứu về chủng *Bacillus* sp. đã được công bố (Ijaz et al., 2015). Trong đó, pH trung tính từ 7 đến 8 là pH tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus* sp. và trong môi trường hơi kiềm có lợi cho quá trình nitrat hóa dị dưỡng của vi khuẩn *Bacillus* sp. (Mevel and Prieur, 2000). Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy môi trường có tính axit (pH từ 5 đến

6) hoặc kiềm (pH từ 9 đến 10) làm hạn chế sự phát triển của vi khuẩn *Bacillus* sp. Nhận định này phù hợp với nhận định của Sheela et al. (2014). Tác giả cho thấy sự phát triển của các loài *Bacillus* sp. phân lập bị hạn chế ở pH từ 6 đến 6,5 và pH trên 8,5.

4. KẾT LUẬN

Từ mẫu thu thập ở vùng nuôi thủy sản ở Bạch Long, Giao Thủy, Nam Định, 194 chủng vi khuẩn đã được phân lập. Chủng TON1.4 được chọn có khả năng thích nghi với điều kiện môi trường nước ao nuôi. Chủng TON1.4 đã được xác định là loài *Bacillus amyloliquefaciens*. Chủng chọn lọc TON1.4 cũng có khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase, cellulase, protease, phytase và có khả năng kháng *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và

Salmonella typhi. Hơn nữa, chủng TON1.4 có khả năng chịu được pH từ 5 đến 9, nồng độ muối từ 0,5 đến 6%. Kết quả cho thấy chủng TON1.4 phù hợp với điều kiện môi trường nuôi tôm nước lợ ở nước ta.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài Khoa học và Công nghệ cấp tỉnh Nam Định “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất probiotic - đa enzyme và ứng dụng bổ sung trong thức ăn nuôi trồng thủy sản, xử lý môi trường nuôi nhằm tăng hiệu quả kinh tế và đảm bảo tính bền vững tại tỉnh Nam Định” do Viện Tài nguyên và Môi trường, Đại học Quốc gia chủ trì.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bibi, F., Ullah, I., Alvi, S.A., Bakhsh, S.A., Yasir, M., & Al-Ghamdi, A.A.K. (2017). Isolation, diversity, and biotechnological potential of rhizo- and endophytic bacteria associated with mangrove plants from Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research* 16(2): 1-12. future perspectives. *Frontier Microbiology* 9:2429. <https://doi.org/10.4238/gmr16029657>.
- Bao, X., & Shen, W. (2005). Manufacture and application of micro ecological agents. In: www. BIOX. CN 2005-4-16.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A.H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology* 15(7):1917-42. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>.
- da Cruz Ramos, G.F., Ramos, P.L., Passarini, M.R.Z., Vieira Silveira, M.A., Okamoto, D.N., de Oliveira, L.C.G., Zizzo, L.V., Marem, A., Santos Rocha, R.C., da Cruz, J.B., Juliano, L., & de Vasconcellos, S.P. (2016) Cellulolytic and proteolytic ability of bacteria isolated from gastrointestinal tract and composting of a hippopotamus. *AMB Express* 6(1): 17. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0188-x>.
- de Oliveira Costa, L.E., de Queiroz, M.V., Borges, A.C., de Moraes, C.A., & de Araújo, E.F. (2012). Isolation and characterisation of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology* 43(4): 1562-1575. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000041>.
- Hoseinifar, S.H., Sun, Y.Z., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture: A review of current knowledge and future perspectives. *Frontier Microbiology* 9:2429. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>.
- Hung, P.Q., Kumar, S.M., Govindsamy, V., & Annapurna, K. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biology and Fertility of Soils* 44: 155-162. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0189-7>.
- Ijaz, A., Shabir, G., Khan, Q.M., & Afzal, M. (2015). Enhanced remediation of sewage effluent by endophyte-assisted floating treatment wetlands. *Ecological Engineering* 84: 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.025>
- Madhana, S., Kanimozhi, G., & Panneerselvam, A. (2021). Probiotics in shrimp aquaculture. In *Advances in Probiotics*, Academic Press, p. 309-325. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822909-5.00020-4>.
- Mondal, S., Mondal, D., Mondal, T., & Malik, J. (2022). Application of probiotic bacteria for the management of fish health in aquaculture. *Bacterial Fish Diseases*, Academic Press, p.351-378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85624-9.00024-5>.
- Mevel, G., & Prieur, D. (2000). Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 46(5): 465-473. <https://doi.org/10.1139/w00-005>.
- Sutin, S. (2010). Water quality of mullet (*Liza oligolepis*, Bleeker, 1985) at Nakhon Si Thammarat bay, Nakhon Si Thammarat province. *Wicheha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University* 29(2): 58-63.
- Sheela, B., Khasim beebi, S., & Yellaji rao, O. (2014). Bioremediation of ammonia using ammonia oxidizing bacteria isolated from sewage. *International Journal of Environmental*

- Bioremediation & Biodegradation* 2(4): 146-150.
<https://doi.org/10.12691/ijebbb-2-4-1>
- World Bank. (2013). *The World Bank Annual Report*. Washington, DC. ©World Bank.
<https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/16091>. <https://doi.org/10.1596/978-0-8213-9568-4>.
- Ye, M., Sun, L., Yang, R., Wang, Z., & Qi, K. (2017). The optimization of fermentation conditions for producing cellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application to goose feed. *Royal Society open science*, 4(10): 171012.
<https://doi.org/10.1098/rsos.171012>.
- Zulkhairi Amin, F.A., Sabri, S., Ismail, M., Chan, K.W., Ismail, N., Mohd Esa, N., Mohd Lila, M.A., & Zawawi, N. (2020). Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(1):278.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17010278>.